



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM PRODUKCE PHB-HV BAKTERIÍ CUPRIAVIDUS
NECATOR ZA VYUŽITÍ HROZNOVÝCH VÝLISKŮ JAKO
UHLÍKOVÉHO ZDROJE**

PRODUCTION OF PHB-HV FROM GRAPE POMACE BY EMPLOYING A PURE CULTURE OF CUPRIAVIDUS
NECATOR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Jakešová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1446/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Michaela Jakešová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium produkce PHB–HV bakterií *Cupriavidus necator* za využití hroznových výlisků jako uhlíkového zdroje

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Studium režimu přidávání kyseliny valerové na syntézu PHB–HV v Erlenmeyerových baňkách (uhlíkový zdroj: fruktóza).
3. Aplikace režimu přidávání kyseliny valerové, získaného na základě optimalizace v Erlenmeyerových baňkách, na syntézu PHB–HV v bioreaktoru (uhlíkový zdroj: fruktóza).
4. Aplikace optimalizovaných podmínek syntézy PHB–HV za využití hroznových výlisků jako uhlíkového zdroje.
5. Vyhodnocení výsledků a diskuse.
6. Závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Michaela Jakešová
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá produkcí kopolymeru PHB-HV za využití bakterie *Cupriavidus necator* H16. Mikroorganismus byl nejdříve kultivován v Erlenmeyerových baňkách za využití čisté fruktózy jako uhlíkového zdroje, přičemž byl studován režim přidávání kyseliny valerové na syntézu PHB-HV. Dále byl sledován vliv stresového faktoru (ethanolu) na syntézu PHB-HV tímto mikroorganismem. Metoda, získaná na základě optimalizace v Erlenmeyerových baňkách, byla aplikována na syntézu kopolymeru PHB-HV v bioreaktoru, taktéž za využití fruktózy jako uhlíkového zdroje. Dále byl z hroznových výlisků získán po enzymatické hydrolyze cukerný extrakt, který byl využit jako uhlíkový zdroj pro syntézu PHB-HV. Fermentace za využití extraktu z hroznových výlisků byly provedeny jak v Erlenmeyerových baňkách, tak v bioreaktoru. Za využití tohoto alternativního uhlíkového zdroje bylo v Erlenmeyerových baňkách vyprodukováno 3,51 g/l kopolymeru PHB-HV a v bioreaktoru pak 5,06 g/l. Podíl 3-hydroxyvalerátu v rámci kopolymeru činil v prvním případě 23,78 mol. %, ve druhém pak 9,39 mol. %.

ABSTRACT

This bachelor thesis deal with the production of PHB-HV copolymer employing a pure culture of *Cupriavidus necator* H16. First, Erlenmeyer flask's cultivations using pure fructose as a source of carbon were performed. The mode of addition of valeric acid for the synthesis of PHB-HV was studied. Furthermore, the effect of stress factor (ethanol) on PHB-HV synthesis by this microorganism was investigated. The method obtained by optimization in Erlenmeyer flasks was applied to the synthesis of the PHB-HV copolymer in the bioreactor using fructose as a source of carbon, too. Furthermore, after enzymatic hydrolysis, a sugar extract from grape pomace was obtained as a source of carbon for the synthesis of PHB-HV. The fermentation in Erlenmeyer flasks and the bioreactor using an extract of grape pomace was carried out. Using this alternative carbon source 3.51 g/l PHB-HV copolymer was produced in Erlenmeyer flask, 5.06 g/l in bioreactor respectively. In the first case, the proportion of 3-hydroxyvalerate in the copolymer was 23.78 mol. % and in the second one, 9.39 mol. %.

KLÍČOVÁ SLOVA

PHB-HV, *Cupriavidus necator* H16, hroznové výlisky, valorizace, kyselina valerová, stresové podmínky, bioreaktor

KEYWORDS

PHB-HV, *Cupriavidus necator* H16, grape pomace, valorization, valeric acid, stress condition, bioreactor

JAKEŠOVÁ, Michaela. Studium produkce PHB-HV bakterií *Cupriavidus necator* za využití hroznových výlisků jako uhlíkového zdroje. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/114495>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. 39 s. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D. za obětavou pomoc a podnětné připomínky, které mi během práce poskytovala.

Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z týmu doc. Ing. Stanislava Obruči, Ph.D. za cenné rady, připomínky a pomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého mého studia.

Tato práce byla podpořena projektem SoMoPro (projekt č. 6SA18032). Projekt získal finanční prostředky z programu pro výzkum a inovace Horizont 2020 Evropská unie v rámci akcí Marie Skłodowska-Curie a je spolufinancován Jihomoravským krajem dle grantové dohody č. 665860. Poznámka: Tento materiál odráží pouze postoje autora a EU není zodpovědná za jakékoli použití prezentovaných informací.



Jihomoravský kraj



SO-MO-PRO-

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty.....	8
2.1.1	Charakterizace polyhydroxyalkanoátů	8
2.1.2	Poly(3-hydroxybutyrát)	9
2.1.3	Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)	10
2.1.4	Bakteriální producent – <i>Cupriavidus necator</i>	11
2.1.4.1	Vliv stresu na produkci PHA	12
2.2	Alternativní uhlíkové zdroje pro produkci PHA	12
2.2.1	Hroznové výlisky	13
2.3	Kultivační strategie produkce PHA.....	14
2.3.1	Vsádková kultivace	14
2.3.2	Přítokovaná kultivace	15
2.3.3	Kontinuální kultivace	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje.....	16
3.1.1	Použité mikroorganismy	16
3.1.2	Použité chemikálie	16
3.1.3	Použité přístroje.....	16
3.2	Uchovávání a kultivace mikroorganismů.....	17
3.2.1	Živná média pro kultivace s mikroorganismem <i>Cupriavidus necator</i> H16	17
3.2.2	Uchovávání mikroorganismu <i>Cupriavidus necator</i> H16	17
3.2.3	Kultivace v Erlenmeyerových baňkách.....	18
3.2.4	Fed-batch kultivace v bioreaktoru	18
3.3	Metoda zpracování hroznových výlisků pro následnou produkci PHA.....	19
3.4	Metody pro vyhodnocování kultivací a charakterizaci PHA	19
3.4.1	Stanovení koncentrace biomasy	19
3.4.1.1	Stanovení koncentrace biomasy spektrofotometricky (turbidimetrií)	19
3.4.1.2	Stanovení koncentrace biomasy gravimetricky	19
3.4.2	Charakterizace množství PHA plynovým chromatografem opatřeným plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID)	19
3.5	Spektrofotometrické metody pro charakterizaci produkčních médií a hroznových extraktů.....	20
3.5.1	Stanovení redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS).....	20
3.5.2	Stanovení síranu amonného Nesslerovým činidlem	21
3.5.3	Stanovení polyfenolů.....	21

3.5.4	Stanovení flavonoidů.....	21
4	Výsledky a diskuze.....	22
4.1	Kultivace v Erlenmeyerových baňkách.....	22
4.1.1	Uhlíkový zdroj – fruktóza	22
4.1.2	Uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků	24
4.1.3	Srovnání kultivací v Erlenmeyerových baňkách za využití různých uhlíkových zdrojů	25
4.2	Kultivace v bioreaktoru	26
4.2.1	Uhlíkový zdroj – fruktóza	26
4.2.1	Uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků	27
4.2.2	Srovnání kultivací v bioreaktoru za využití různých uhlíkových zdrojů	29
5	ZÁVĚR.....	33
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	34
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	39

1 ÚVOD

V posledních dekáдах rostou obavy z budoucího vyčerpání ropy, jejíž zásoby se čím dál rychleji snižují. Významně tomu přispívá nezanedbatelná spotřeba fosilních paliv, ale také celosvětový nárůst spotřeby plastické hmoty. Právě tyto důvody vedly vědce i průmyslové podniky k vývoji udržitelných technologií, díky kterým by mohli být produkovány bioplasty, jejichž výroba by byla založena na obnovitelných zdrojích, které by částečně doplnily, či dokonce zcela nahradily zdroje neobnovitelné. Poslední roky ukazují, že slibným kandidátem v této problematice by mohli být polyhydroxyalkanoáty, které disponují podobnými mechanickými vlastnostmi jako plasty produkováné petrochemickým průmyslem [1; 2; 3; 4].

Polyhydroxyalkanoáty jsou vyráběny biotechnologickou produkcí za využití nejrozličnějších mikroorganismů. Pokud se podíváme na veškeré průmyslově využívané biotechnologické produkce, zjistíme, že cena jednotlivých produktů se značně liší. Mezi ty nejlevnější můžeme zařadit např. methan, ethanol či fruktózový sirup. Na vyšší cenové hladině se pak pohybují produkce organických kyselin, aminokyselin či pekařského droždí. Nejdražší biotechnologické výrobky jsou pak např. antibiotika, enzymy či vitamíny. Výroba polyhydroxyalkanoátů je řazena k těm nákladnějším z nich. Vysoká cena (v porovnání s plasty produkovánými chemickým průmyslem) znemožňuje polyhydroxyalkanoátům zaujmout významnější pozici na světových trzích [5; 6; 7].

Z výše uvedených důvodů se objevují snahy snížit celkové náklady produkce polyhydroxyalkanoátů. Ty závisí na nejrozličnějších faktorech: od zdroje substrátu, přes výtěžnost zvolené kultivační strategie až po extrakci a čištění produktu. Vzhledem k tomu, že výhodou biotechnologických výrob je možnost využití širokého pole substrátů, směřují snahy snížení ceny polyhydroxyalkanoátů právě k využívání cenově dostupnějších zdrojů živin, které by v ideálním případě pocházely z obnovitelných surovin. V poslední době se z tohoto důvodu pozornost upíná k lignocelulóзовým materiálům, které jsou dostupné po celém světě, a navíc bývají často odpadem nějaké průmyslové výroby, což výrazně snižuje jejich výkupní cenu [2; 6; 8].

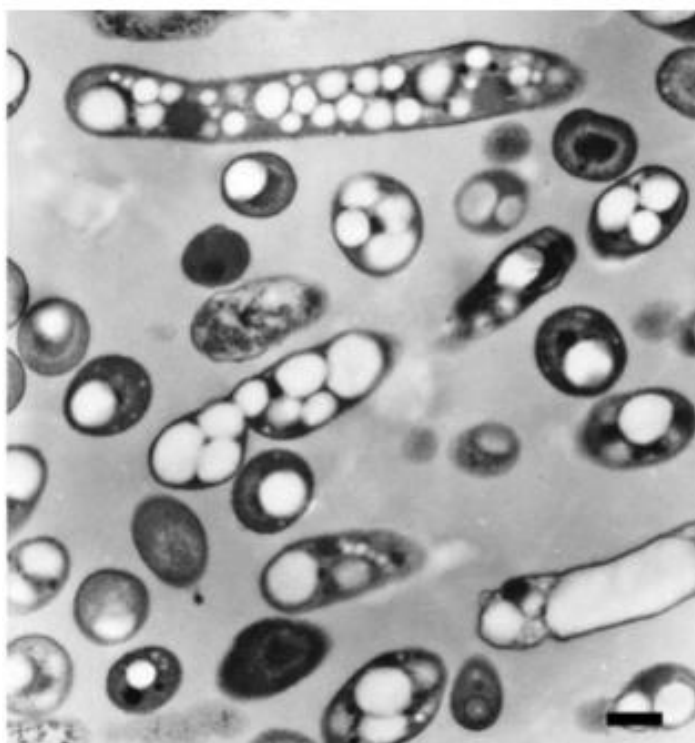
Slibným lignocelulóзовým materiálem se zdají být hroznové výlisky – odpad vinařského průmyslu, jejichž suchý podíl bývá často více než z poloviny tvořen vlákninou, která obsahuje právě celulózu a hemicelulózy. Tak jako u jiných lignocelulóзовých materiálů, i zde se nabízí možnost tento průmyslový odpad zhydrolyzovat a cukerný extrakt pak využít jako uhlíkový zdroj pro produkci polyhydroxyalkanoátů [8; 9; 10; 11].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

2.1.1 Charakterizace polyhydroxyalkanoátů

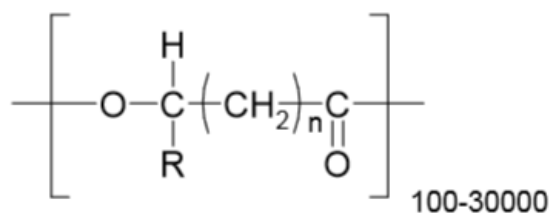
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biodegradibilní a biokompatibilní látky náležející do skupiny polyesterů hydroxyalkanových kyselin. PHA jsou produkovány velkým množstvím gramnegativních a grampozitivních bakterií a v buňkách jsou uloženy ve formě granulí (Obrázek 1), které mohou být následně využity jako zásobní zdroj uhlíku. Dalším významným benefitem, kterou pro bakterie představuje akumulace rezervních polymerů, je zvýšená odolnost kultur vůči změnám v prostředí, díky níž se zvyšuje tolerance vůči stresu, a tedy i větší konkurenceschopnost v porovnání s PHA-nesyntetizujícími bakteriemi [2; 5; 12; 13].



Obrázek 1 Snímek z transmisního elektronového mikroskopu bakterie *Cupriavidus necator* syntetizující polymer PHB [14]

Všechny polyhydroxalkanoáty mají stejnou základní strukturu monomerních jednotek (Obrázek 2). Dle délky uhlíkatého řetězce konkrétního monomeru rozdělujeme PHA do tří skupin:

- i. s krátkým řetězcem / scl-PHA / short-chain lenght (3–5 atomů uhlíku)
- ii. se středně dlouhým řetězcem / mcl-PHA / medium-chain lenght (6–14 atomů uhlíku)
- iii. s dlouhým řetězcem / lcl-PHA / long-chain lenght (více než 14 atomů uhlíku) [12].



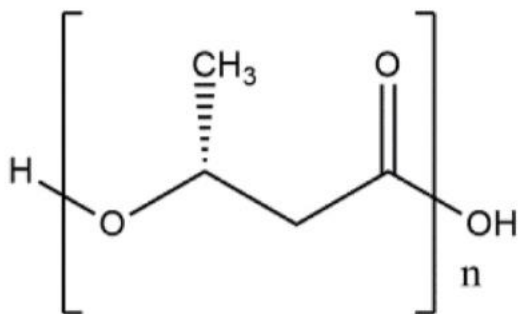
Obrázek 2 Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů [12]

Od struktury monomerních jednotek se následně odvíjí mechanické vlastnosti konkrétního bioplastu, a tedy i průmyslové využití; počínaje obalovými materiály a předměty denní potřeby na jedno použití, přes chirurgické stehy, nosiče léků až po tkáňové inženýrství [2].

Za typické představitele polyhydroxyalkanoátů bývají nejčastěji označovány poly(3-hydroxybutyrát) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát), které nejenže už v současné době nalézají praktické uplatnění, ale navíc se na nich výborně demonstruje rozmanitost vlastností různých PHA, proto se jim budeme v následujícím textu více věnovat [15].

2.1.2 Poly(3-hydroxybutyrát)

Vůbec prvním izolovaným polyhydroxyalkanoátem byl poly(3-hydroxybutyrát), uváděný pod zkratkou PHB, resp. P(3HB) (jeho strukturu zobrazuje Obrázek 3). Mezi mikroorganismy najdeme celou řadu producentů tohoto polymeru, avšak nejvíce studovaná a využívaná je v poslední době bakterie *Cupriavidus necator*, v jejíchž buňkách bývá až 90 % suchého hmotnostní podílu tvořeno akumulovaným PHB [7; 12; 16; 17].



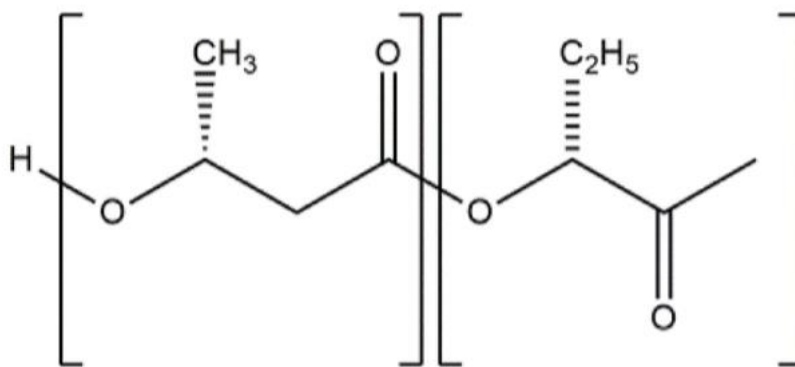
Obrázek 3 Struktura PHB [18]

Po fyzikální stránce je PHB krystalický biopolymer s teplotou tání 180 °C. Tato skutečnost je problematická z hlediska následného průmyslového zpracování, protože již při 200 °C PHB degraduje. Výše uvedené vlastnosti způsobují křehkost, kterou je poly(3-hydroxybutyrát) charakteristický a která jej omezuje uplatnit se v mnohých odvětvích (chirurgie – stehy). Ne vždy jsou však jeho vlastnosti na škodu, takže např. v oblasti biomedicinských materiálů nebo jako nosič léčiv se skvěle upotřebí. Vedle již zmíněné krystalinity – která mnohdy dosahuje až 70 % – lze v souvislosti s PHB hovořit i o vysokém modulu pružnosti (2,5–3 GPa) a vysoké pevnosti v tahu (35–40 MPa). Navíc vykazuje

vynikající bariérové vlastnosti, čehož lze v praxi využít u obalových materiálů. Hodnoty prodloužení při přetržení má naopak velmi nízké – kolem 5 až 7 % [17; 19; 20].

2.1.3 Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

Kopolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) uváděn také pod zkratkami P(3HB-co-3HV), P3HBV nebo PHB-HV je dalším členem z rodiny polyhydroxyalkanoátů (strukturu PHB-HV zobrazuje Obrázek 4).



Obrázek 4 Struktura kopolymeru PHB-HV [18]

Charakterizace tohoto bioplastu bude ovšem mnohem složitější, než tomu bylo v případě PHB. Konkrétní hodnoty různých veličin jsou přímo závislé na procentuálním podílu 3-hydroxyvalerátu. Už při 5–10 % podílu se výrazně snižuje hodnota teploty tání, tvrdost i krystalinita materiálu. Pokud je 3-hydroxyvalerát zastoupen v kopolymeru PHB-HV 20 %, pohybuje se tažnost materiálu okolo 50 %, což je v porovnání s PHB (± 6 %) mnohem vyšší hodnota, která se se zvyšujícím se podílem 3HV taktéž zvyšuje. Tím se dostává PHB-HV do popředí konkurentů polypropylenu, kde se tažnost pohybuje mezi 100 až 600 %. To, že se PHB a PHB-HV od sebe liší je mnohdy zřetelné již na první pohled, a co víc, mnohdy jsme schopni od sebe odlišit vzorky PHB-HV s různým podílem 3HV – toto demonstruje Obrázek 5 [12; 21].



Obrázek 5 Filmy PHB, resp. PHB-HV (tloušťka filmu 40 μm), zleva: PHB, PHB-HV s 15, 23 a 27 % 3HV [1]

2.1.4 Bakteriální producent – *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator H16 známý také jako *Wautersia eutropha* H16 či *Ralstonia eutropha* je gramnegativní bakterie vyskytující se v půdě a sladké vodě. Jak již bylo výše uvedeno, tato bakterie dokáže akumulovat ve své buňce obrovské množství PHA, to ovšem platí pouze pro sčl-řetězce. Tohoto faktoru však vědci využívají a za pomoci této bakterie syntetizují PHB a PHB-HV. Mikrobiální produkce PHA pomocí této bakterie je založena na omezení množství dusíku, a naopak přítomnosti zvýšeného množství uhlíku [3; 14; 22].

Další výhodou této bakterie je skutečnost, že dokáže právě jako uhlíkový substrát využít řadu rozmanitých organických substrátů, ba dokonce i oxid uhličitý (čehož se taktéž vědci snaží využít v souvislosti se zvyšováním množství CO_2 v atmosféře). Pokud se však zaměříme pouze na heterotrofní růst, mohou sloužit jako zdroje uhlíku meziprodukty Krebsova cyklu, cukerné kyseliny, mastné kyseliny, aminokyseliny, alkoholy či aromatické sloučeniny. Z důvodu absence klíčových enzymů Embden-Meyerhoff-Parnas dráhy může bakterie *Cupriavidus necator* z cukrů využívat pouze fruktózu a N-acetylglukosamin, které mohou být katabolizovány Entner-Doudoroff dráhou [23; 24].

Zatímco k produkci PHB stačí dodat bakterii některý z výše uvedených substrátů, pro produkci kopolymeru PHB-HV, je nutné dodat ještě nějaký prekurzor pro produkci 3HV. V minulosti tak byla použita např. kyselina propionová či valerová, v případě jiných mikroorganismů pak například propanol či kyselina levulová [19; 25; 26; 27].

2.1.4.1 Vliv stresu na produkci PHA

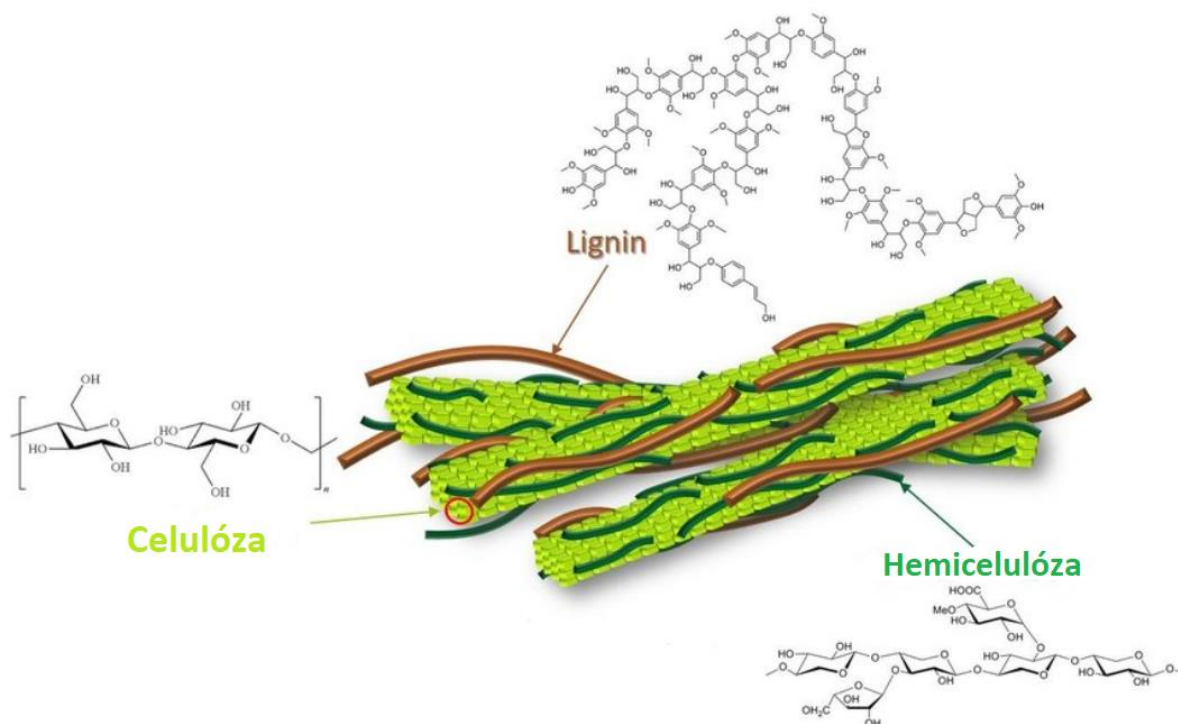
Již v předchozích kapitolách bylo uvedeno, že bakterie jsou schopny přežít i přes nevýhodné životní podmínky, přičemž PHA syntetizující bakterie bývají ještě odolnější. Bylo zjištěno, že působením určitých stresových faktorů můžeme zvýšit výtěžnost produkce PHA. Konkrétně, pokud je bakterie *Cupriavidus necator* na počátku stacionární fáze vystavena ethanolu nebo peroxidu vodíku, zvýší se výtěžky PHB přibližně o 30 % (jako uhlíkový zdroj byla využita fruktóza). Stresové faktory měly dále za následek zvýšení molekulové hmotnosti PHB (ve srovnání s kultivací bez stresových faktorů). Jednotlivé molekulové hmotnosti se dále lišily v závislosti na koncentraci stresových faktorů. Vliv ethanolu, jakožto stresového faktoru, na produkci kopolymeru PHB-HV bakterií *Cupriavidus necator* nebyl doposud prozkoumán [28].

2.2 Alternativní uhlíkové zdroje pro produkci PHA

Většímu využívání polyhydroxyalkanoátů, jakožto biodegradabilních plastů, jednoznačně brání jejich vysoká cena (4,3–5,26 \$/kg) v porovnání s komerčními plasty jako je např. polystyren (zde se cena pohybuje v rozmezí 1,6–1,9 \$/kg). Z předchozí kapitoly o polyhydroxyalkanoátech vyplývá, že k jejich produkci je nutná přítomnost velkého množství (v naprosté většině případů) organického uhlíku. A právě náklady na uhlíkatý substrát tvoří jednu z položek, které zapříčiňují vysokou cenu PHA. Při valorizaci nějakého odpadu (jeho využití jako uhlíkatého zdroje) odpadají etické otázky, které bývají s bioplasty často spojovány. V kontextu milionů hladovějících lidí po celém světě se objevují pochyby, zda je společensky snesitelné vyrábět tyto látky (bioplasty) ze surovin, které konkurují potravinovému řetězci buď samotnému člověku, či zvířatům. Výše uvedené důvody tedy vedly vědce k využívání nejrozumnějších průmyslových odpadů jako uhlíkových zdrojů pro produkci PHA [8; 22; 29].

Jedním ze směrů, kterým se lze vydat, je využití lignocelulózového materiálu. Jedná se o udržitelnou a celosvětově dostupnou alternativu. Navíc lignocelulózové materiály bývají často odpadem např. v potravinářském průmyslu, zemědělství či lesnictví, čímž se stávají jasnými kandidáty na cenově nejdostupnější uhlíkové zdroje pro produkci PHA. Lignocelulóza obvykle obsahuje 40–80 % celulózy, 10–40 % hemicelulózy a 5–25 % ligninu (strukturu lignocelulózového materiálu demonstruje Obrázek 6). Zatímco lignin je složen z aromatických podjednotek, celulóza a hemicelulózy jsou polymery složené z monomerů glukózy, mannózy, galaktózy, xylózy, arabinózy a rhamnózy. Pokud tedy lignocelulózový materiál podlehně hydrolýze, získáváme směs látek ideálních pro fermentace [8; 30].

Pro produkci polyhydroxyalkanoátů byly z lignocelulózových materiálů úspěšně použity např. listy a stonky kukuřice, pšeničná sláma, kávová sedlina, odpad po zpracování dřeva nebo sběrný papír. Jak je vidět, produkce PHA za využití lignocelulózových materiálů má hned dva benefity: prvním je valorizace odpadů pro výrobu produktů s přidanou hodnotou (v tomto případě pro výrobu PHA), druhým pak snížení nákladů pro tvorbu těchto produktů [8; 31; 32; 33; 34; 35].

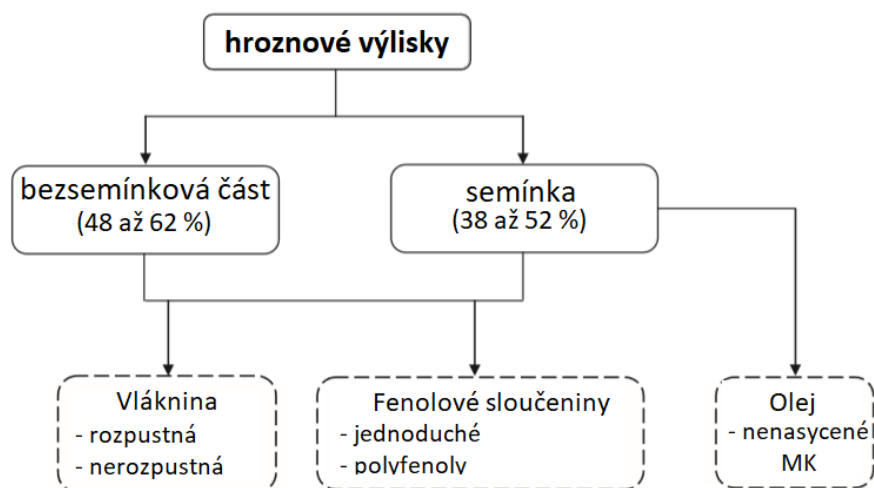


Obrázek 6 Struktura rostlinného lignocelulózového materiálu [36]

2.2.1 Hroznové výlisky

Z celosvětové produkce vinných hroznů je určeno 75 % pro vinařský průmysl. Po vylisování moštu ze rmutu dochází ke značné produkci matolin (hroznové výlisky) – přibližně 15–30 hm. % zpracovaných hroznů. Ty obsahují především slupky z bobulí, dále pak semínka a třapiny (složení hroznových výlisků demonstruje Obrázek 7). V rámci úsilí o snižování produkce odpadů se vyskytují tendence tento vedlejší produkt vinařské průmyslu dále využít. Jednou z možných variant je zkrmování skotem, tímto způsobem lze však zužít pouze malou část světové produkce. Matoliny totiž obsahují třísloviny, hořké látky a kyselinu vinnou, které mohou zapříčinit různé zažívací potíže zvířat. Další možností je využít výlisky na výrobu destilátů, ta obvykle nebývá příliš efektivní. V neposlední řadě lze matoliny i kompostovat. Podíváme-li se na tuto problematiku s nadhledem, tak hroznové výlisky ve skutečnosti nemají žádné hlavní průmyslové využití, ve větším měřítku negenerují zisk ani nešetří peníze [9; 37].

Jak je uvedeno v Tabulce 1, hroznové výlisky obsahují značné množství vlákniny, která je z velké části tvořena právě celulórou a hemicelulózami. Jak již bylo výše uvedeno, hydrolýzou těchto polysacharidů můžeme získat redukující cukry, které lze dále využít pro fermentační produkci. Hroznové výlisky by se tedy mohly řadit mezi další levné uhlíkové zdroje pro produkci PHA.



Obrázek 7 Složení hroznových výlisků

Tabulka 1 Množství vlákniny ve vybraných hroznových výliscích (uvedeno v g/100 g vysušeného materiálu) [9; 10; 11]

Odrůda	Celkové množství vlákniny	Rozpustná vláknina	Nerozpustná vláknina
<i>Mario Mucato</i>	17,3	0,84	16,40
<i>Merlot</i>	51,1	1,50	49,60
<i>Pinot noir (Deng et. al.)</i>	56,3	1,70	54,60
<i>Pinot noir (Beres et al.)</i>	51,4	-	-
<i>Cabernet S.</i>	53,2	52,40	0,81

2.3 Kultivační strategie produkce PHA

Jak již bylo výše zmíněno, udržitelnost PHA a zejména pak jejich konkurenceschopnost na světových trzích, je úzce spojena s jejich cenou. Jedním ze způsobů, jak je možné cenu snížit je využití nízkonákladového uhlíkové zdroje (kapitola 2.2.1). Dalším neméně důležitým aspektem je zvolení účinné kultivační techniky, která zajistí vysoké produkční výtěžky spojené s co možná nejnižšími provozními náklady [38].

Mezi základní kultivační strategie řadíme kultivace vsádkové, přítokované a kontinuální (Obrázek 8). Každá z těchto strategií je při produkci PHA využívána, proto je nutné se s každou z nich seznámit [39].

2.3.1 Vsádková kultivace

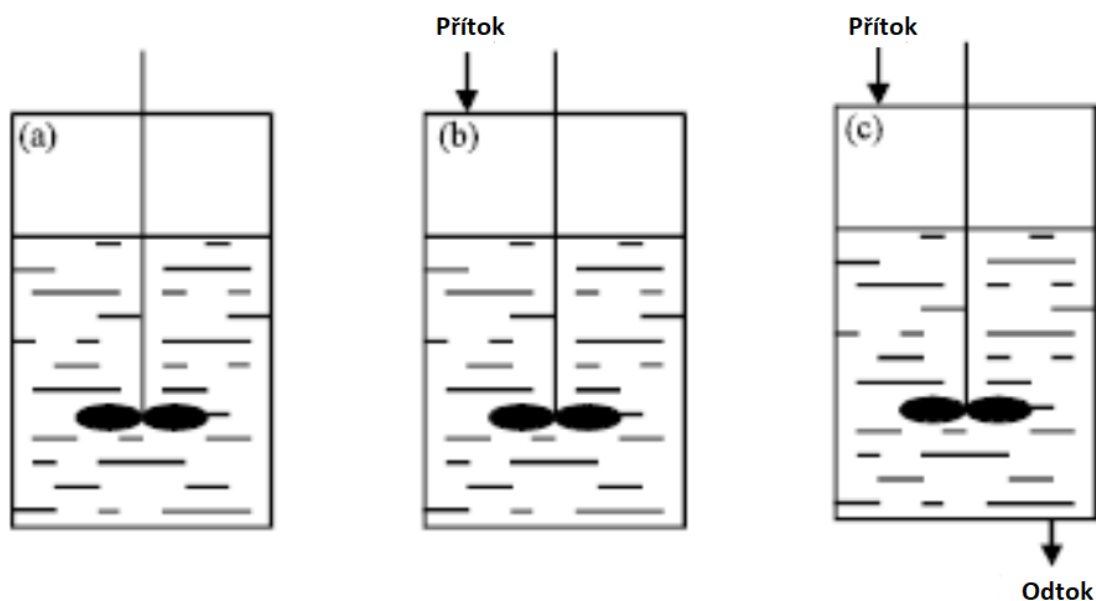
Přední výhodou této kultivační strategie je její jednoduchá proveditelnost. Na začátku procesu jsou do vysterilovaného média přivedené veškeré živiny a inokulum. V průběhu fermentace již do média žádné živiny dodávány nejsou, po jejich spotřebování je proces ukončen. Při tomto typu kultivace však dochází ke značným časovým ztrátám, a to jednak při lag-fázi, dále pak při zakládání nové vsádky a její sterilizace. Z tohoto důvodu bývá tento typ kultivační strategie využíván při maloobjemových produkcích či při optimalizaci metod [40; 41].

2.3.2 Přítokovaná kultivace

O poznání složitější je přítokovaná (fed-batch) kultivace, kdy je jedna nebo více živin do produkčního média přidávána během fermentace (celkový objem média se tedy navyšuje). Díky tomuto faktoru může dojít k navýšení produkce a s tím spojené zlepšení ekonomiky procesu. Přidávky živin jsou do produkčního média přiváděny v pravidelných intervalech, nebo pouze v případě výraznějšího poklesu koncentrace příslušné živiny. Aktuální množství dané látky v médiu je zjišťováno buď přímo – měřením dané koncentrace, nebo nepřímo – podle koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH či sledování optické hustoty. Zvolený způsob přítoku živin může taktéž výrazně ovlivnit množství vyprodukovaného PHA. Právě tento typ kultivace je vhodný pro produkce, kde je nutné limitovat určité živiny z důvodu cílených metabolických změn či kde výrazně hrozí inhibice substrátem, z tohoto důvodu bývá často vědci využíván pro produkci PHA ve větším, často i pilotním měřítku. V potravinářském a farmaceutickém průmyslu a v průmyslu zpracování odpadů patří tato kultivační strategie mezi ty vůbec nejpoužívanější [4; 38; 41; 42; 43; 44].

2.3.3 Kontinuální kultivace

Při této kultivační strategii, stejně jako tomu bylo u přítokované fermentace, dochází k dodávání živin do produkčního média v průběhu kultivace. Celkový objem média se však nenavyšuje, jelikož je z fermentačního zařízení část produkčního média odebírána. Po odběru části média zůstávají v bioreaktoru mikrobiální buňky různého stáří. Pokud buňky v médiu setrvávají výrazně déle, než je střední doba prodlení ($\frac{\text{objem kapaliny v bioreaktoru}}{\text{objemový průtok této kapaliny}}$), zvyšuje se riziko kontaminace média či mutace produkčního mikroorganismu. Výhodou tohoto typu kultivace je snížení prodlení produkce z důvodu vyprazdňování a opětovného plnění a sterilizování bioreaktoru. Dále pak je touto kultivační strategií možné zajistit stejnou kvalitu produktu a v neposlední řadě je možné odhalit kinetiku růstu buněk a dynamiku celého procesu [29; 39; 40; 41].



Obrázek 8 Schematicky znázorněné kultivační strategie (a – vsádková, b – přítokovaná, c – kontinuální) [45]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

V experimentální části bakalářské práce byl využitým mikroorganismem *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) – Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

3.1.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth (Himedia)
- Agar Powder (Himedia)
- Heptahydrát síranu hořečnatého, p.a. (Lach-Ner)
- Síran amonný, p.a. (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lach-Ner)
- Fruktóza, p.a. (Lach-Ner)
- Kyselina valerová (Sigma-Aldrich)
- Ethanol (Merck KGaA)
- Chloroform, p.a. (Lach-Ner)
- Kyselina benzoová (Lachema)
- Hydroxid sodný, p.a. (Lach-Ner)
- Kyselina sírová, p.a. (Lach-Ner)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Serva)
- Uhličitan sodný (Lach-Ner)
- Kyselina gallová (Loba Chemie)
- Dusitan sodný (Lachema)
- Chlorid hlinitý (Lach-Ner)
- Glukóza, p.a. (Lach-Ner)
- Kyselina 3,5-dinitrosalicylová (Sigma-Aldrich)
- Vínan sodno-draselný (Lachema)
- Nesslerovo činidlo (Sigma-Aldrich)
- Methanol (VWR)
- Glycerin bezvodý, p.a. (Lach-Ner)
- Silicone antifoam fluid (Witco)
- Katechin (Verkon)
- Viscozyme L (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Použité přístroje

- Bioreaktor BioFlo/CelliGen 115 (New Brunswick)
- Autokláv V-95 (Systec)
- Plynový chromatograf Trace 1300, FID detektor, kolona: TG-WaxMS (Thermo Scientific)
- Vodní lázeň BL 4/150 (WSL)
- Nanofotometr P-Class P 300 (Implen)

- Spektrofotometr Helios Delta (Thermo Spectronic)
- Vortex mixer BV 1000 (Benchmark Scientific)
- Vortex Reax Top/control (Heidolph)
- Očkovací box Aura Mini (BioAir)
- pH metr InoLab 720 SET (WTW)
- Centrifuga EBA 200 (Hettich)
- Váhy laboratorní HL-100 (Scaltec)
- Váhy analytické HR-120-EC (A&D)
- Termoblok SBH130D (Stuart)
- Magnetická míchačka (Lavatec)
- Temperovaná třepačka UNIMAX 1010 (Heidolph)
- Orbitální třepačka s inkubací ES-20 (Biosan)
- Inkubátor FD 53 (Binder)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.2 Uchovávání a kultivace mikroorganismů

3.2.1 Živná média pro kultivace s mikroorganismem *Cupriavidus necator* H16

Pro přípravu inokula bylo použito komplexní médium Nutrient broth (NB) obsahující na 1 000 ml destilované vody 10 g peptonu, 10 g kvasničného extraktu a 5 g NaCl.

Produkční médium

Produkční (minerální) médium (MSM – mineral salt medium) obsahovalo v 1 000 ml destilované vody následující složky:

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
Roztok mikroelementů	1,0 ml

Roztok mikroelementů obsahoval v 1 000 ml 0,1 M HCl následující složky:

FeCl ₃	9,7 g
CaCl ₂	7,8 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156 g
CoCl ₂	0,119 g
NiCl ₂	0,118 g
CrCl ₂	0,062 g

Jako zdroj uhlíku v produkčním médium byla použita čistá fruktóza – 20 g fruktózy na 1 000 ml média, nebo extrakt z hroznových výlisků – 50 g redukujících cukrů na 1 000 ml média.

Minerální médium, roztok mikroelementů a fruktóza byly odděleně vysterilizovány.

3.2.2 Uchovávání mikroorganismu *Cupriavidus necator* H16

Bakterie byly uchovávány dvěma způsoby – na agarových plotnách a v kryozkumavkách. Pro přípravu agarových ploten byla vysterilizována směs obsahující na 1 000 ml destilované vody 25 g Nutrient broth a 17 g Agar powderu, následně byla vylita do Petriho misek.

Po ztuhnutí byly agarové plotny zaočkovány a ponechány v inkubátoru při 30 °C na 24 h. Po ukončení kultivace se Petriho misky uchovávaly při 4 °C 30 dnů, po uplynutí této doby bylo nutné přeočkování mikroorganismů na nové agarové plotny.

Pro uchování mikroorganismů v mrazu byly využity kryozkumavky. Do vystřerilovaných kryozkumavek obsahujících 0,5 ml 30% roztoku glycerolu byl přidán 1 ml 24 hodin rostlého inokula (příprava viz kapitola 3.2.3). Kryozkumavky byly uchovány při teplotě –20 °C.

3.2.3 Kultivace v Erlenmeyerových baňkách

Cupriavidus necator byl kultivován v inokulačním médiu (Obrázek 9) o objemu 50 ml v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml za následujících podmínek: kultivační doba: 24 h, teplota 30 °C, otáčky 170 rpm.



Obrázek 9 Inokulační médium před kultivací (1.) a po 24 h kultivací (2.)

Produkční kultivace PHA byla provedena v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml. Ke 100 ml MS média byl asepticky přidán roztok mikroelementů a uhlíkový zdroj. Toto médium bylo očkováno 10 ml inokula. Kultivace probíhala 72 h za teploty 30 °C a rychlost otáček činila 170 rpm.

V různých časových intervalech byla k produkčnímu médiu asepticky přidávána kyselina valerová (2 g/l [46]), popř. ethanol (1 % v/v [28]).

3.2.4 Fed-batch kultivace v bioreaktoru

Produkční kultivace PHA byla provedena v bioreaktoru, jehož objem činí 2 l. K 1,2 l minerálního média byl asepticky přidán roztok mikroelementů a uhlíkový zdroj. Toto médium bylo očkováno 130 ml inokula (*Cupriavidus necator* byl kultivován v inokulačním médiu o objemu 130 ml v Erlenmeyerových baňkách o objemu 300 ml za podmínek viz kapitola 3.2.3.). Teplota kultivace v bioreaktoru se držela na 30 °C, pH 7 bylo udržováno díky

1M H₂SO₄ a 30% NaOH. Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla monitorována kyslíkovou elektrodou.

Přídavek 2 g/l kyseliny valerové byl rozdělen do dvou dávek, které byly přidány poté co, koncentrace biomasy byla srovnatelná s hodnotami při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách.

V průběhu kultivace byly spektrofotometricky stanovovány koncentrace redukující sacharidů a síranu amonného. V případě potřeby byly tyto látky do média dodávány. Pokud docházelo k výraznému pění média, bylo do bioreaktoru aplikováno malé množství antifoam činidla.

3.3 Metoda zpracování hroznových výlisků pro následnou produkci PHA

K dispozici byly dva různé vzorky hroznových výlisků:

- i. Směs Veltlín zelený a Sauvignon Blanc, září 2018, vinařství Vavříček, Břeží u Mikulova
- ii. Müller Thurgan, říjen 2017, vinařství Réva Rakvice.

Výše uvedené vzorky byly za optimálních podmínek podrobeny enzymatické hydrolýze pomocí komerční směsi enzymů Viscozyme L. Přefiltrovaný a zakonzentrovaný extrakt z hroznových výlisků (obsahující přibližně 38 % fruktózy) byl následně využit pro kultivace jakožto uhlíkový zdroj.

3.4 Metody pro vyhodnocování kultivací a charakterizaci PHA

V průběhu kultivace byly asepticky odebírány vzorky pro následné zpracování výsledků.

3.4.1 Stanovení koncentrace biomasy

3.4.1.1 Stanovení koncentrace biomasy spektrofotometricky (turbidimetrií)

Pro získání informací o stavu produkčního média byla sledována intenzita zákalu produkčního média. Odebrané vzorky byly vhodně naředěny a proměřeny na spektrofotometru při 630 nm proti destilované vodě. Díky této analýze jsme mohli usuzovat, zda nám kultura roste či naopak umírá. Toto měření sloužilo pouze pro získání orientačních výsledků, pro přesnější stanovení biomasy byla použita gravimetrická metoda.

3.4.1.2 Stanovení koncentrace biomasy gravimetricky

V průběhu kultivace bylo v pravidelných intervalech odebíráno 10 ml produkčního média. Odebrané vzorky byly zcentrifugovány, dvakrát přečištěny destilovanou vodou a po dosažení konstantní hmotnosti byla biomasa zvážena. Díky této metodě bylo určeno množství nakultivované biomasy v produkčním médiu v závislosti na produkčním čase a použitých kultivačních podmínkách.

3.4.2 Charakterizace množství PHA plynovým chromatografem opatřeným plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID)

Pro stanovení obsahu PHA v biomase byla využita technika GC-FID. Před samotnou chromatografickou analýzou bylo nutné vzorek biomasy zpracovat následujícím způsobem. S přesností na 4 desetinná místa bylo naváženo přibližně 10 mg biomasy do krimpovacích vialek. K biomase byl napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml interní směsi (15% kyselina

sírová v methanolu s obsahem kyseliny benzoové 5 mg/ml). Směs byla v zakrimpovaných vialkách esterifikována v termobloku (Obrázek 10) 3 hodiny při 94 °C. Poté byl obsah krimpovací vialky převeden do šroubovací vialky obsahující 0,5 ml 0,5 mM NaOH. Zašroubované vialky byly protřepány. Po oddělení fází ve vialce bylo ze spodní (chloroformové) fáze odpipetováno 50 µl kapaliny do jiné šroubovací vialky (vlastníci víčko se septem), která obsahovala 950 µl chloroformu. Takto připravené vzorky byly společně se stejně připravenými standardy PHA zanalyzovány pomocí GC-FID.



Obrázek 10 Esterifikace směsi v zakrimpovaných vialkách v termobloku

3.5 Spektrofotometrické metody pro charakterizaci produkčních médií a hroznových extraktů

V průběhu fed-batch kultivace v bioreaktoru je nutné vyhodnocovat aktuální množství redukujících cukrů a síranu amonného v produkčním médiu, aby je v případě potřeby bylo možné doplnit. Extrakty z hroznových výlisků charakterizují informace o množstvích redukujících cukrů, polyfenolů a flavonoidů. Pro stanovení látek, které charakterizují produkční média a extrakty z hroznových výlisků, byly využity následující spektrofotometrické metody.

3.5.1 Stanovení redukujících sacharidů pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS)

Pro přípravu činidla DNS je nutné rozpustit 2 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylové ve 100 ml destilované vody a 40 ml 2M NaOH. V tomto roztoku se poté rozpustí 60 g vínanu sodno-draselného. Vzniklý roztok se doplní vodou tak, aby celkový objem činil 200 ml.

Při analýze je ve zkumavce vždy smícháno 0,5 ml DNS činidla a 0,5 ml roztoku obsahující redukující sacharidy. Poté je vzorek 10 minut inkubován ve vodní lázni o teplotě 70 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu je do zkumavky napipetováno 10 ml destilované vody a vzorek je proměřen na spektrofotometru při 540 nm proti slepému vzorku.

Pro získání kalibrační křivky je nutné 0,5 ml DNS činidla smísit vždy s 0,5 ml roztokem glukózy o koncentraci 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 a 3,0 g/l. Pracovní postup je nadále shodný s pracovním postupem analýzy vzorku.

3.5.2 Stanovení síranu amonného Nesslerovým činidlem

Do odměrné baňky o objemu 50 ml je přidáno 30 ml destilované vody, 2 ml Nesslerova činidla a 50 μ l vzorku. Baňka se doplní po značku a po patnácti minutách se změří absorbance při 450 nm proti vodě.

Obdobným způsobem jsou připraveny a proměřeny body kalibrační křivky standardního roztoku síranu amonného.

3.5.3 Stanovení polyfenolů

Po naředění Folin-Ciocalteuova činidla v poměru 1:9 (v/v) s vodou je 1 ml tohoto roztoku napipetován do zkumavky k 1 ml destilované vody a 50 μ l vhodně naředěného vzorku. Po pěti minutách je napipetován 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po 15 minutách je vzorek změřen při 750 nm proti slepému vzorku [47].

Pro kalibrační křivku je jako standard využit roztok kyseliny gallové o koncentraci 0,1–0,5 mg/ml [47].

3.5.4 Stanovení flavonoidů

Do zkumavky je k 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% NaNO_2 napipetováno 0,5 ml vhodně naředěného vzorku. Po pěti minutách se do zkumavky přidá 0,2 ml 10% AlCl_3 a po dalších pěti minutách 1,5 ml 1M NaOH a 1 ml destilované vody. Patnáct minut se směs nechá stát a poté je proměřena na spektrofotometru při 510 nm proti destilované vodě [47].

Pro kalibrační křivku je jako standard využit roztok katechinu o koncentraci 0,05–0,30 mg/ml [47].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kultivace v Erlenmeyerových baňkách

4.1.1 Uhlíkový zdroj – fruktóza

V Erlenmeyerových baňkách byl studován režim přidávání kyseliny valerové na produkci PHB-HV. Dále byl studován vliv přidávání ethanolu, jakožto stresového faktoru, díky němuž jsme chtěli dosáhnout větší výtěžnosti metody. V Tabulce 2 jsou popsány jednotlivé experimenty.

Tabulka 2 Popis experimentů provedených v Erlenmeyerových baňkách – uhlíkový zdroj: fruktóza (zkratky: KV – kyselina valerová, etOH – ethanol, přidavek po X h – čas přidavku v hodinách od inokulace produkčního média)

Typ testování	Vzorek	Protokolové číslo	Charakterizace
Kontrola	PHA_1	MJ 1	bez přidavku KV
Přídavek KV v jedné dávce	PHA_2	MJ 2	přídavek KV ihned po inokulaci
	PHA_3	MJ 9	přídavek KV po 18 h
	PHA_4	MJ 5	přídavek KV po 21 h
	PHA_5	MJ 3	přídavek KV po 24 h
Přídavek KV ve dvou dávkách	PHA_6	MJ 12	první přídavek KV po 18 h a druhý po 24 h
	PHA_7	MJ 8	první přídavek KV po 21 h a druhý po 24 h
	PHA_8	MJ 20	první přídavek KV po 24 h a druhý po 27 h
Přídavek KV a etOH v jedné dávce	PHA_9	MJ 10	přídavek KV a etOH po 18 h
	PHA_10	MJ 13	přídavek KV po 18 h, přídavek etOH ihned po inokulaci
	PHA_11	MJ 6	přídavek KV a etOH po 21 h
	PHA_12	MJ 15	přídavek KV po 21 h, přídavek etOH ihned po inokulaci
	PHA_13	MJ 18	přídavek KV a etOH po 24 h
	PHA_14	MJ 17	přídavek KV po 24 h, přídavek etOH ihned po inokulaci
Přídavek KV nebo etOH ve dvou dávkách	PHA_15	MJ 11	přídavek KV a první přídavek etOH po 18 h, druhý přídavek etOH po 24 h
	PHA_16	MJ 14	první přídavek KV a etOH po 18 h, druhý přídavek KV a etOH po 24 h
	PHA_17	MJ 7	přídavek KV a první přídavek etOH po 21 h, druhý přídavek etOH po 24 h
	PHA_18	MJ 16	první přídavek KV a etOH po 21 h, druhý přídavek KV a etOH po 24 h
	PHA_19	MJ 19	přídavek KV a první přídavek etOH po 24 h, druhý přídavek etOH po 24 h
	PHA_20	MJ 21	první přídavek KV a etOH po 24 h, druhý přídavek KV a etOH po 27 h

V průběhu kultivací byly odebírány vzorky, po jejichž gravimetrické analýze byly zjištěny koncentrace biomasy v produkčních médiích. Hodnoty koncentrací biomasy před přidavkem kyseliny valerové a po ukončení kultivace (tedy po 72 h od inokulace) jsou uvedeny v Tabulce 3. V této tabulce jsou dále uvedeny hodnoty celkového množství PHA v produkčním

médiu po ukončení kultivace a také procentuální podíl 3-hydroxyvalerátu (HV) v rámci kopolymeru. Tyto hodnoty byly získány po GC analýze.

Tabulka 3 Produkce biomasy a PHA (uhlíkový zdroj – fruktóza) po aplikaci kyseliny valerové/ethanolu (P1 – koncentrace biomasy před přidavkem či před prvním přidavkem KV; P2 – koncentrace biomasy před druhým přidavkem KV/etOH)

Vzorek	Biomasa (P1) [g/l]	Biomasa (P2) [g/l]	Biomasa (po ukončení kultivace) [g/l]	PHA [g/l]	3HV [% mol.]
PHA_2	0,09	—	0,15	ND	ND
PHA_3	2,42	—	2,85	1,74	34,28
PHA_4	3,08	—	3,78	2,50	22,74
PHA_5	2,90	—	3,98	2,51	31,63
PHA_6	2,31	2,71	6,66	3,61	26,77
PHA_7	3,28	3,47	4,40	3,32	35,63
PHA_8	3,30	3,38	5,01	2,74	31,50
PHA_9	2,47	—	3,20	1,84	28,57
PHA_10	2,02	—	2,25	1,04	28,29
PHA_11	2,97	—	3,25	1,90	9,80
PHA_12	2,42	—	2,70	1,31	15,52
PHA_13	3,35	—	3,70	2,04	13,05
PHA_14	2,84	—	2,77	1,21	5,31
PHA_15	2,37	2,39	3,08	1,67	29,64
PHA_16	2,31	2,50	5,00	2,39	25,04
PHA_17	3,10	3,17	3,50	2,25	12,67
PHA_18	2,95	3,06	4,25	2,13	28,34
PHA_19	3,28	3,30	3,79	2,12	14,69
PHA_20	3,27	3,28	4,01	2,17	27,11
Vzorek	Biomasa (po 24 h od inokulace) [g/l]		Biomasa (po ukončení kultivace) [g/l]	PHA [g/l]	3HV [% mol.]
PHA_1	3,15		8,31	5,28	0,00

Jak bylo uvedeno v kapitole 2.1.4.1, stresové podmínky mohou v určitých případech pozitivně ovlivnit produkci PHA bakterií *Cupriavidus necator*. Pro některé experimenty (uvedeny jsou v Tabulce 2) byl jako stresový faktor použit ethanol. Do jisté míry můžeme považovat za stresový faktor i kyselinu valerovou, jejíž brzká aplikace do média může způsobit inhibici růstu kultury (jako je to v případě experimentu PHA_2). Tuto skutečnost můžeme pozorovat na Obrázku 11, kde se baňka s označením 2. na první pohled odlišuje od ostatních baněk. Právě v této baňce je produkční médium mnohem světlejší a řidší (v porovnání s médii ve vedlejších baňkách. To značí nižší optickou hustotu a s tím související nízké množství vyprodukovaného PHA. V případě experimentů PHA_10, PHA_12 a PHA_14, kdy byl ethanol aplikován do produkčního média bezprostředně po jeho inokulaci, zaznamenáváme nejnižší hodnoty vyprodukovaného PHA (viz Tabulka 3). Pokud byl ethanol aplikován po alespoň 18 hodinách, množství vyprodukovaného PHA již bylo vyšší, obzvláště v případě, že přidavek aplikovaného ethanolu byl rozdělen do dvou menších dávek. Ovšem i přesto, že byl ethanol aplikován ve dvou dávkách buď s jednou dávkou kyseliny valerové, anebo se dvěma menšími

dávkami kyseliny valerové, nebyl ani v jednom případě pozorován pozitivní efekt aplikace ethanolu na produkci PHA.



Obrázek 11 Produkční média PHA (zleva: 1. – PHA_1, 2. – PHA_2, 3. – PHA_5, 4. – PHA_13)

Rozdělení přídavku kyseliny valerové do dvou dávek však pozitivní vliv na produkci PHA mělo. To demonstrují experimenty PHA_6, PHA_7 a PHA_8. Na těchto vzorcích můžeme pozorovat, že vyšší podíl 3-hydroxyvalerátu v kopolymeru je přítomen na úkor nižšího celkového množství kopolymeru. Největší množství vyprodukované biomasy a kopolymeru PHB-HV pozorujeme u vzorku PHA_6, kde je hodnota množství vyprodukované biomasy 6,66 g/l a hodnota množství vyprodukovaného kopolymeru 3,61 g/l. První dávka kyseliny valerové byla v případě tohoto experimentu aplikována po 18 h od inokulace a druhá pak o 6 h později.

4.1.2 Uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků

Pro kultivace byly využity dva různé extrakty:

- i. Extrakt ze směsi hroznových výlisků Veltlínu zeleného a Sauvignon Blanck (E1) s parametry:
 - Redukující cukry: 169,44 g/l
 - Polyfenoly: 1,86 g/l
 - Flavonoidy: 1,76 g/l.
- ii. Extrakt z hroznových výlisků odrůdy Müller Thurgan (E2) s parametry:
 - Redukující cukry: 296,70 g/l
 - Polyfenoly: 1,33 g/l
 - Flavonoidy: 2,12 g/l.

První extrakt (E1 – ze směsi hroznových výlisků) obsahuje (vzhledem k množství redukujících cukrů) více flavonoidů než druhý extrakt (E2). V případě polyfenolů je tento trend ještě významnější, tedy množství polyfenolů v prvním extraktu (vzhledem k množství redukujících cukrů) je výrazně vyšší než v případě druhého extraktu.

Při kultivaci za využití extraktu z hroznových výlisků v Erlenmeyerových baňkách byla využita stejná kultivační strategie jako při experimentu PHA_6. Kyselina valerová tedy byla přidána ve dvou dávkách, a to po 18 a 24 hodinách. V Tabulce 4 jsou opět shrnuty výsledky z jednotlivých experimentů. Při použití extraktu E1 (experiment PHA_E1) bylo vyprodukováno mnohem nižší množství biomasy a PHA než při použití extraktu E2 (experiment PHA_E2). Značné množství polyfenolů a flavonoidů v extraktu E1 vedlo ke zpomalení růstu kultury, což mělo za následek nízkou optickou hustotu v době přidavků kyseliny valerové. Tato skutečnost, tak jako tomu bylo již při experimentu PHA_2, vedla k nízkému množství vyprodukované biomasy i PHA. Naopak výsledky experimentu PHA_E2 jsou srovnatelné s výsledky experimentu PHA_6. Extrakt z hroznových výlisků (které jsou v dnešní době pouze odpadem vinařského průmyslu) v tomto případě plně nahradil funkci čisté fruktózy.

Tabulka 4 Produkce biomasy a PHA (uhlíkový zdroj – hroznové extrakty) po aplikaci kyseliny valerové (P1 – koncentrace biomasy před prvním přidavkem KV; P2 – koncentrace biomasy před druhým přidavkem KV)

Vzorek	Biomasa (P1) [g/l]	Biomasa (P2) [g/l]	Biomasa (po ukončení kultivace) [g/l]	PHA [g/l]	3HV [% mol.]
PHA_E1	0,26	0,35	1,41	0,02	0,00
PHA_E2	2,15	3,15	6,11	3,51	23,78

4.1.3 Srovnání kultivací v Erlenmeyerových baňkách za využití různých uhlíkových zdrojů

V této kapitole porovnáme nejlepší experimenty z kapitol 4.1.1 a 4.1.2. Při využití čisté fruktózy jako uhlíkového zdroje bylo nejlepších výsledků dosaženo při experimentu PHA_6 v případě využití extraktu z hydrolyzovaných hroznových výlisků to byl experiment PHA_E2.

Souhrn výsledků experimentu PHA_6:

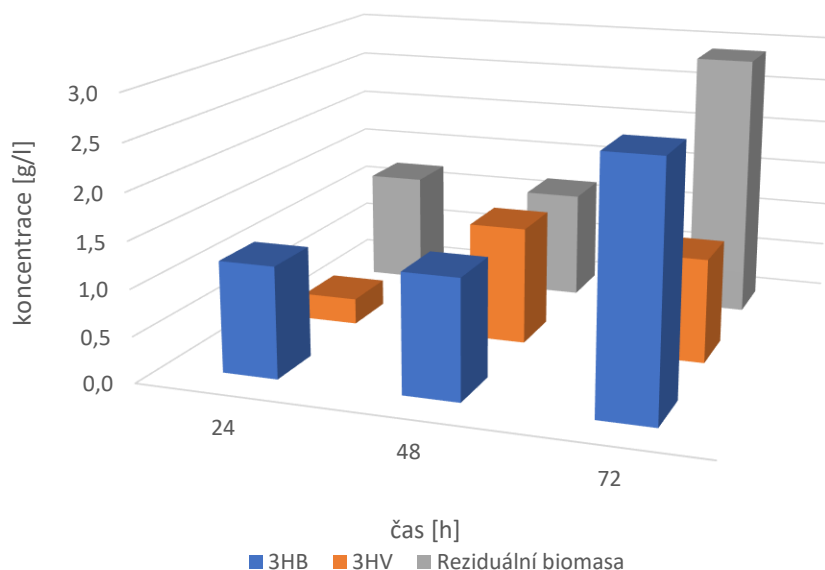
- Biomasa: 6,66 g/l
- PHB-HV: 3,61 g/l
- Podíl 3HV: 26,77 % mol.

Souhrn výsledků experimentu PHA_E2:

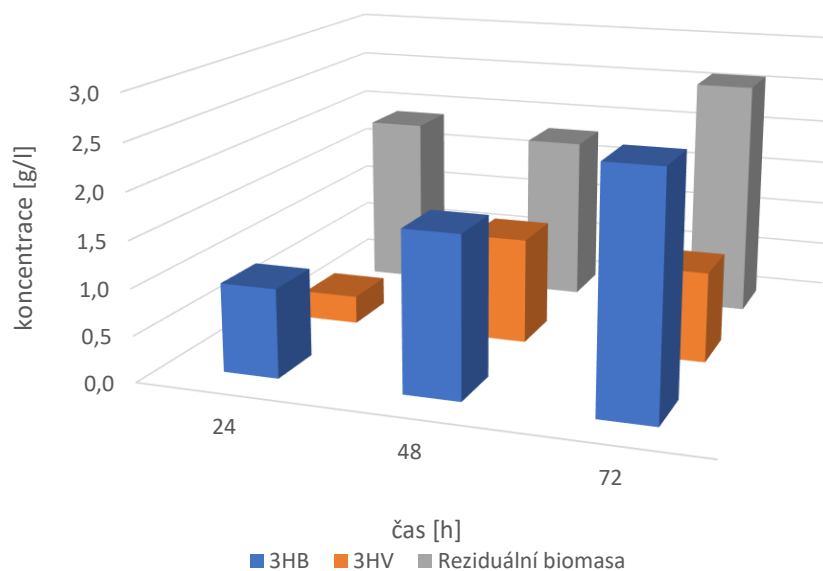
- Biomasa: 6,11 g/l
- PHB-HV: 3,51 g/l
- Podíl 3HV: 23,78 % mol.

Dle hodnot množství biomasy, kopolymeru PHB-HV a podílu 3HV jednotek v kopolymeru po 72 hodinách kultivace v Erlenmeyerových baňkách se jeví výsledky experimentů PHA_6 a PHA_E2. Srovnáme-li produkci jednotlivých složek v závislosti na čase při využití fruktózy (Obrázek 12) a extraktu z hroznových výlisků (Obrázek 13), i zde se obě kultivace velmi podobají. V obou případech došlo mezi 48. a 72. hodinou kultivace k výraznému navýšení 3HB

jednotek, zatímco množství 3HV jednotek mírně pokleslo. Po ukončení kultivace byl podíl reziduální biomasy při experimentu PHA_6 43,43 % z celkového množství biomasy, u experimentu PHA_E2 to bylo 42,50 %



Obrázek 12 Množství vyprodukovaného 3HB, 3HV a reziduální biomasy v závislosti na čase při experimentu PHA_6



Obrázek 13 Množství vyprodukovaného 3HB, 3HV a reziduální biomasy v závislosti na čase při experimentu PHA_E2

4.2 Kultivace v bioreaktoru

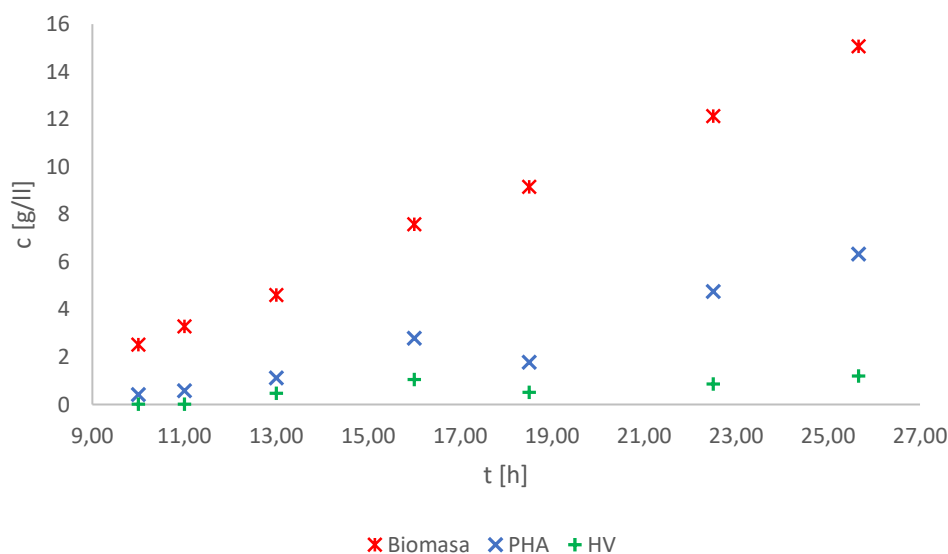
4.2.1 Uhlíkový zdroj – fruktóza

Režim přidávání kyseliny valerové při experimentu PHA_6 (kapitola 4.1.1) v Erlenmeyerových baňkách se osvědčil i při využití nestandardního uhlíkového zdroje (kapitola 4.1.2), byl tedy

vyhodnocen jako vhodný kandidát i pro kultivace v bioreaktoru. Vzhledem k tomu, že v bioreaktoru probíhají kultivace rychleji než v Erlenmeyerových baňkách (optimální pH a aerace), bylo nutné odhadnout, kdy se nacházejí bakterie při kultivaci v bioreaktoru ve stejné růstové fázi jako při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách u vybrané kultivační strategie. Informace o aktuálním stavu kultury je zapotřebí z důvodu vhodného načasované aplikace přísad kyseliny valerové do produkčního média. K tomuto účelu byla spektrofotometricky sledována intenzita zákalu média, která souvisí právě s aktuální koncentrací biomasy. Při kultivaci v bioreaktoru za využití fruktózy (PHA_B1) jako uhlíkového zdroje byla kyselina valerová aplikována při koncentraci biomasy 3,28 g/l, respektive 4,61 g/l. Stručný přehled o kultivaci PHA_B1 je uveden v Tabulce 5. Množství biomasy, celkového PHA a 3-hydroxyvalerátu v závislosti na čase demonstruje Obrázek 14. Kultivace proběhla ve fed-batch módu, v případě potřeby byl do bioreaktoru doplněn uhlíkový nebo dusíkový zdroj.

Tabulka 5 Produkce biomasy a PHA v bioreaktoru (uhlíkový zdroj – fruktóza) po aplikaci kyseliny valerové (P1 – koncentrace biomasy před prvním přidavkem KV; P2 – koncentrace biomasy před druhým přidavkem KV)

Vzorek	Biomasa (P1) [g/l]	Biomasa (P2) [g/l]	Biomasa (po ukončení kultivace) [g/l]	PHA [g/l]	3HV [% mol.]
PHA_B1	3,28	4,61	15,06	6,33	16,19



Obrázek 14 Množství biomasy, celkového PHA a 3-hydroxyvalerátu v závislosti na čase při kultivaci v bioreaktoru (uhlíkový zdroj – fruktóza)

4.2.1 Uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků

Pro kultivaci v bioreaktoru (označení experimentu PHA_B2) byly využity jako uhlíkové zdroje dva extrakty z hroznových výlisků odrůdy Müller Thurgan:

- i. Extrakt E3:
 - Redukující cukry: 173,41 g/l
 - Polyfenoly: 1,83 g/l

- Flavonoidy: 1,75 g/l.
- ii. Extrakt E4
- Redukující cukry: 468,54 g/l
 - Polyfenoly: 3,42 g/l
 - Flavonoidy: 1,92 g/l.

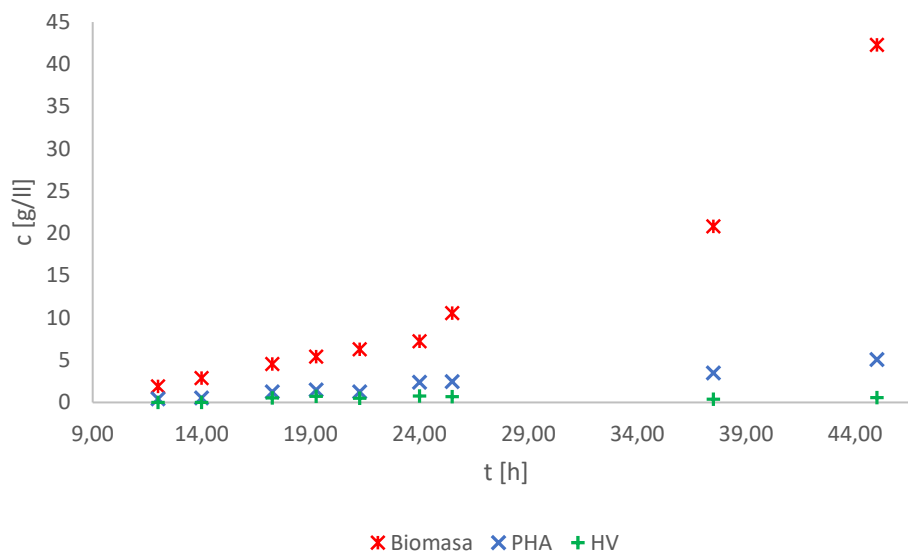
Kultivace byla zahájena za využití extraktu E3 (Obrázek 15), po jeho vyčerpání byl využit extrakt E4. Stejně jako při kultivaci v bioreaktoru za využití fruktózy, tak i v průběhu tohoto experimentu byl v případě potřeby doplňován uhlíkový nebo dusíkový zdroj. Přídavky kyseliny valerové byly do produkčního média aplikovány při koncentraci biomasy 2,88 g/l, respektive 3,53 g/l. Stručný přehled o kultivaci PHA_B2 je uveden v Tabulce 6. Množství biomasy, celkového PHA a 3-hydroxyvalerátu v závislosti na čase demonstruje Obrázek 16.



Obrázek 15 Extrakt (E3) z hroznových výlisků (upraven na pH 7)

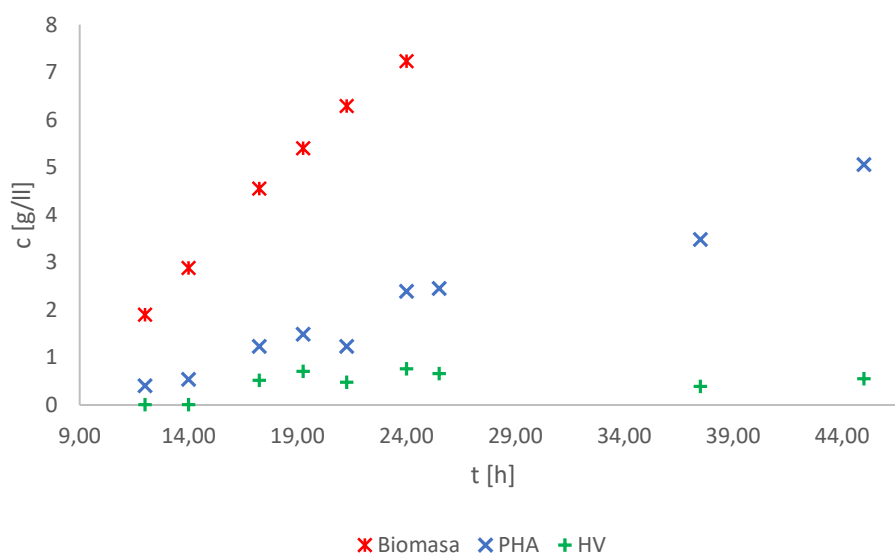
Tabulka 6 Produkce biomasy a PHA v bioreaktoru (uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků) po aplikaci kyseliny valerové (P1 – koncentrace biomasy před prvním přídavkem KV; P2 – koncentrace biomasy před druhým přídavkem KV)

Vzorek	Biomasa (P1) [g/l]	Biomasa (P2) [g/l]	Biomasa (po ukončení kultivace) [g/l]	PHA [g/l]	3HV [% mol.]
PHA_B2	2,88	3,53	42,29	5,06	9,39



Obrázek 16 Množství biomasy, celkového PHA a 3-hydroxyvalerátu v závislosti na čase při kultivaci v bioreaktoru (uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků)

Vzhledem k tomu, že poslední tři hodnoty množství biomasy vyobrazené v Obrázku 16 jsou mnohem větší než hodnoty ostatní, byl vytvořen Obrázek 17, kde jsou tyto hodnoty odebrány, čímž se obrázek stává přehlednějším.



Obrázek 17 Množství biomasy, celkového PHA a 3-hydroxyvalerátu v závislosti na čase při kultivaci v bioreaktoru (uhlíkový zdroj – extrakt z hroznových výlisků), po odběru některých hodnot

4.2.2 Srovnání kultivací v bioreaktoru za využití různých uhlíkových zdrojů

V této kapitole porovnáme experiment PHA_B1, kdy byla pro kultivaci v bioreaktoru použita čistá fruktóza, s experimentem PHA_B2, kdy byl pro kultivaci v bioreaktoru použit extrakt z hroznových výlisků.

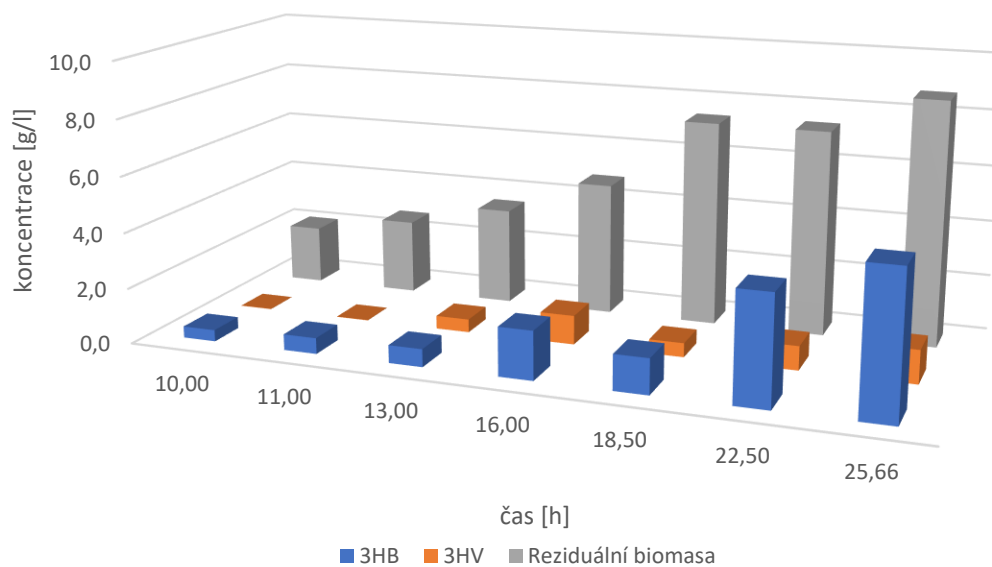
Souhrn výsledků experimentu PHA_B1:

- Biomasa: 15,06 g/l
- PHB-HV: 6,33 g/l
- Podíl 3HV: 16,19 % mol.

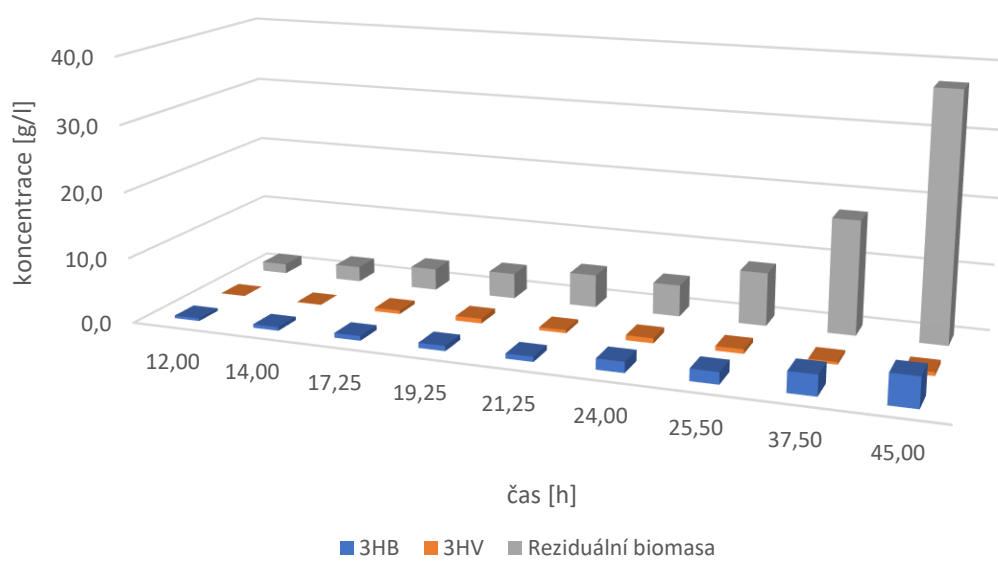
Souhrn výsledků experimentu PHA_B2:

- Biomasa: 42,29 g/l
- PHB-HV: 5,06 g/l
- Podíl 3HV: 9,39 % mol.

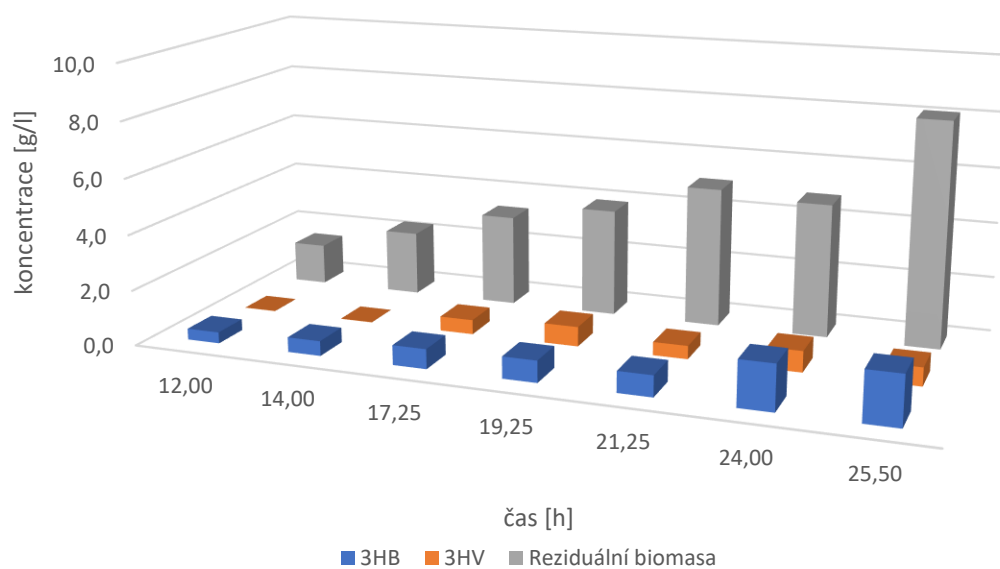
Hodnoty množství biomasy, kopolymeru PHB-HV a podílu 3HV jednotek v kopolymeru po ukončení kultivace jsou v tomto případě značně odlišné. V případě využití experimentu PHA_B2 byl poměr množství vyprodukovaného kopolymeru ku množství vyprodukované biomasy podstatně nižší než při experimentu PHA_B1. Produkci kopolymeru při experimentu PHA_B2 mohla negativně ovlivnit kumulace od fruktózy jiných redukujících cukrů, které byly rovněž přítomny v extraktu, ale nebyly spotřebovávány bakteriální kulturou. Dále pak průběh fermentace mohla ovlivnit kumulace polyfenolů a flavonoidů, které do bioreaktoru proudily s hroznovým extraktem. Oba tyto negativní jevy by mohli být při následujícím studiu této problematiky eliminovány využitím kontinuálního způsobu fermentace. Podíl 3HV jednotek v rámci kopolymeru byl taktéž při experimentu PHA_B2 nižší než v případě experimentu PHA_B1. V obou případech je však podíl 3HV jednotek v kopolymeru výrazně nižší než při kultivacích v Erlenmeyerových baňkách. Srovnáme-li produkci jednotlivých složek v závislosti na čase při využití fruktózy (Obrázek 18) a extraktu z hroznových výlisků (Obrázek 19, respektive Obrázek 20 – v tomto obrázku byly odebrány hodnoty náležející dvěma posledním odběrům, které byly během kultivace provedeny), i zde je odlišnost obou kultivací na první pohled zřejmá. Srovnáme-li poslední hodnotu reziduální biomasy na Obrázku 18 a poslední hodnotou reziduální biomasy na Obrázku 20, vidíme, že jsou přibližně stejné. Podíváme-li se však u příslušných hodnot reziduálních biomas i na množství vyprodukovaného kopolymeru, hodnoty z experimentu PHA_B2 jsou podstatně nižší než v případě experimentu PHA_B1. Podíl reziduální biomasy byl na konci kultivace experimentu PHA_B1 57,95 % z celkového množství biomasy, u experimentu PHA_B2 v čase 25,50 h 76,81 % a na konci kultivace 88,04 %.



Obrázek 18 Množství vyprodukovaného 3HB, 3HV a reziduální biomasy v závislosti na čase při experimentu PHA_B1



Obrázek 19 Množství vyprodukovaného 3HB, 3HV a reziduální biomasy v závislosti na čase při experimentu PHA_B2



Obrázek 20 Množství vyprodukovaného 3HB, 3HV a reziduální biomasy v závislosti na čase při experimentu PHA_B2 (bez údajů z posledních dvou odběrů)

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala produkcí kopolymeru PHB-HV, jednoho ze členů polyhydroxyalkanoátů za využití bakterie *Cupriavidus necator* H16. Jako uhlíkové zdroje pro bakteriální produkci kopolymeru byly využívány dva typy substrátů – prvním byla čistá fruktóza, druhým pak extrakt z hroznových výlisků. Čistá fruktóza byla k fermentaci využita v případě optimalizace produkční strategie.

Pro efektivní produkci kopolymeru bylo nutné nastudovat režim přidávání kyseliny valerové na syntézu PHB-HV v Erlenmeyerových baňkách. Nejvyšších výtěžků biomasy, respektive kopolymeru bylo dosaženo při experimentech, kdy byl přírůstek kyseliny valerové rozdělen do dvou dávek. Vůbec nejlepší výsledky byly zaznamenány u experimentu, při němž byla kyselina valerová aplikována po 18, respektive 24 hodinách. V okamžiku bezprostředně před aplikací prekursoru byla koncentrace biomasy v produkčním médiu 2,31 g/l, respektive 2,71 g/l. Po 72 hodinách fermentace činilo množství biomasy v médiu 6,66 g/l a množství PHB-HV 3,61 g/l. Podíl 3HV v rámci kopolymeru činil 26,77 % mol. Vedle studia režimu přidávání kyseliny valerové byl sledován i režim přidávání ethanolu, jakožto stresového faktoru, s cílem navýšit výtěžnost produkce PHB-HV. Aplikace ethanolu do produkčního média neměla na produkci kopolymeru pozitivní efekt, tudíž nebyla zahrnuta do kultivační strategie.

Na základě režimu přidávání kyseliny valerové na syntézu PHB-HV získaného při optimalizaci metody v Erlenmeyerových baňkách byla provedena přítokovaná fermentace v bioreaktoru. V průběhu kultivace bylo sledováno množství uhlíkového a dusíkového zdroje v médiu, které byly v případě potřeby do média dodány. Jelikož bioreaktor udržuje optimální podmínky, které daný mikroorganismus vyžaduje, probíhá fermentace mnohem rychleji než v Erlenmeyerových baňkách. Z tohoto důvodu byly přírůstky kyseliny valerové aplikovány po dosažení dostatečného množství nakultivované biomasy. Po ukončení fermentace činilo množství biomasy v médiu 15,06 g/l a množství PHB-HV 6,33 g/l. Podíl 3HV v rámci kopolymeru činil 16,19 % mol.

Při kultivaci v Erlenmeyerových baňkách za využití optimalizovaných podmínek syntézy PHB-HV a alternativního zdroje uhlíku byly k dispozici dva vzorky hroznových výlisků různého původu. Pro efektivní produkci kopolymeru se osvědčil vzorek s nižším obsahem polyfenolů a flavonoidů. Produkce biomasy, respektive PHB-HV byla při využití extraktu z hydrolyzovaných hroznových výlisků (v případě vzorku s nižším obsahem polyfenolů a flavonoidů) srovnatelná s hodnotami z fermentace za využití čisté fruktózy. Za využití alternativního zdroje uhlíku činilo množství biomasy v médiu po 72 h kultivace 6,11 g/l a množství PHB-HV 3,51 g/l. Podíl 3HV v rámci kopolymeru činil 23,78 % mol.

Dále byl alternativní uhlíkový zdroj použit při fermentaci v bioreaktoru. Stejně tak, jako v případě kultivace v bioreaktoru za využití čisté fruktózy, i v tomto případě se jednalo o přítokovanou fermentaci, při níž byly sledovány koncentrace zdrojů uhlíku a dusíku a v případě potřeby do média doplňovány. Taktéž přírůstky kyseliny valerové byly do produkčního média aplikovány až po dosažení dostatečného množství nakultivované biomasy. Po ukončení fermentace činilo množství biomasy v médiu 42,29 g/l a množství PHB-HV 5,06 g/l. Podíl 3HV v rámci kopolymeru činil 9,39 % mol.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LEMECHKO, Pierre, Magali LE FELLIC a Stéphane BRUZAUD. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using agro-industrial effluents with tunable proportion of 3-hydroxyvalerate monomer units. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **128**, 429-434. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.170. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018372192>
- [2] GAHLAWAT, Geeta a Sanjeev Kumar SONI. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresource Technology*. 2017, **243**, 492-501. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.139. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241731043X>
- [3] PEDERSON, Erik N., Christopher W. J. MCCHALICHER a Friedrich SRIENC. Bacterial Synthesis of PHA Block Copolymers. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(6), 1904-1911. DOI: 10.1021/bm0510101. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm0510101>
- [4] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Ondrej SNAJDAR, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*. 2010, **32**(12), 1925-1932. DOI: 10.1007/s10529-010-0376-8. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-010-0376-8>
- [5] BRAUNEGG, GERHART, RODOLFO BONA, FLORIAN SCHELLAUF a ELISABETH WALLNER. Polyhydroxyalkanoates(PHAs): sustainable biopolyester production. *Polimery*. 2002, **47**(07), 479-484. DOI: 10.14314/polimery.2002.479. ISSN 00322725. Dostupné také z: <http://en.www.ichp.pl/Polyhydroxyalkanoates-PHAs>
- [6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biotechnologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. ISBN 80-708-0121-2.
- [7] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, **89**, 161-174. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>
- [8] AL-BATTASHI, Huda Sultan, Neelamegam ANNAMALAI, Nallusamy SIVAKUMAR, Saif AL-BAHRY, Bhumi Nath TRIPATHI a Quang D. NGUYEN. Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019, **18**(1), 183-205. DOI: 10.1007/s11157-018-09488-4. ISSN 1569-1705.
- [9] BERES, Carolina, Gislaine N.S. COSTA, Ignacio CABEZUDO et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*. 2017, **68**, 581-594. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.07.017. ISSN 0956053X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X17305093>

- [10] DENG, Qian, Michael H. PENNER a Yanyun ZHAO. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*. 2011, **44**(9), 2712-2720. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.05.026. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911003425>
- [11] BERES, Carolina, Fernanda F. SIMAS-TOSIN, Ignacio CABEZUDO, Suely P. FREITAS, Marcello IACOMINI, Caroline MELLINGER-SILVA a Lourdes M.C. CABRAL. Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. *Food Chemistry*. 2016, **201**, 145-152. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.039. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616300383>
- [12] ZAPLETAL, M. a J. TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické listy*. 2016, **110**(12), 860-867.
- [13] AYUB, Nicolás D., M. Julia PETTINARI, Jimena A. RUIZ a Nancy I. LÓPEZ. A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*. 2004, **49**(3), 170-174. DOI: 10.1007/s00284-004-4254-2. ISSN 0343-8651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-004-4254-2>
- [14] TIAN, J., A. J. SINSKEY a J. STUBBE. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*. 2005, **187**(11), 3814-3824. DOI: 10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005>
- [15] BARHAM, Peter J., Phil BARKER a Sally J. ORGAN. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and copolymers of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, **103**(2-4), 280-298. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05850.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05850.x>
- [16] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Jana OBORNA a Ivana MAROVA. Application of protease-hydrolyzed whey as a complex nitrogen source to increase poly(3-hydroxybutyrate) production from oils by *Cupriavidus necator*. *Biotechnology Letters*. 2014, **36**(4), 775-781. DOI: 10.1007/s10529-013-1407-z. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-013-1407-z>
- [17] SEN, Khok Yong, M. Hazwan HUSSIN a Siti BAIDURAH. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, **17**, 51-59. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.006. ISSN 18788181. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818118305516>
- [18] TEBALDI, Marli Luiza, Ana Luiza Chaves MAIA, Fernanda POLETTTO, Fabricio Vieira DE ANDRADE a Daniel Cristian Ferreira SOARES. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019, **51**, 115-126. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.02.007. ISSN 17732247. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224718308578>
- [19] ARAMVASH, Asieh, Samira HAJIZADEH-TURCHI, Fatemeh MOAZZENI-ZAVAREH, Narges GHOLAMI-BANADKUKI, Narges MALEK-SABET a Zeinab AKBARI-SHAHABI. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in

- Cupriavidus necator and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, **87**, 397-404. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016302252>
- [20] YEO, Jayven Chee Chuan, Joseph K. MUIRURI, Warintorn THITSARTARN, Zibiao LI a Chaobin HE. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications: Approaches, advantages and applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, **92**, 1092-1116. DOI: 10.1016/j.msec.2017.11.006. ISSN 09284931. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117333246>
- [21] DU, Guocheng C., Jian CHEN, Jian YU a Shiyi LUN. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*. 2001, **8**(2), 103-110. DOI: 10.1016/S1369-703X(01)00091-2. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X01000912>
- [22] ZANFONATO, Kellen, Mélodi SCHMIDT, Luci Kelin QUINES, Cláudia Santos GAI, Willibaldo SCHMIDELL a Gláucia Maria Falcão de ARAGÃO. CAN VINASSE BE USED AS CARBON SOURCE FOR POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCTION BY *Cupriavidus necator* DSM 545?. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2018, **35**(3), 901-908. DOI: 10.1590/0104-6632.20180353s20170265. ISSN 1678-4383.
- [23] GHYSELS, Stef, Md. Salatul Islam MOZUMDER, Heleen DE WEVER, Eveline I.P. VOLCKE a Linsey GARCIA-GONZALEZ. Targeted poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bioplastic production from carbon dioxide. *Bioresource Technology*. 2018, **249**, 858-868. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.10.081. ISSN 0960-8524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417319107>
- [24] CRAMM, Rainer. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2009, **16**(1-2), 38-52. DOI: 10.1159/000142893. ISSN 1660-2412. Dostupné také z: <https://www.karger.com/Article/FullText/142893>
- [25] DOI, Yoshiharu, Masao KUNIOKA, Yoshiyuki NAKAMURA a Kazuo SOGA. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from carbon-13 labeled acetate and propionate. *Macromolecules*. 1987, **20**(12), 2988-2991. DOI: 10.1021/ma00178a006. ISSN 0024-9297. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00178a006>
- [26] SHANG, Longan, Seong Chun YIM, Hyun Gyu PARK a Ho Nam CHANG. Sequential Feeding of Glucose and Valerate in a Fed-Batch Culture of *Ralstonia eutropha* for Production of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with High 3-Hydroxyvalerate Fraction. *Biotechnology Progress*. 2004, **20**(1), 140-144. DOI: 10.1021/bp034232o. ISSN 87567938. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp034232o>
- [27] GOGOTOV, I. N., V. A. GERASIN, Ya. V. KNYAZEV, E. M. ANTIPOV a S. Kh. BARAZOV. Composite biodegradable materials based on polyhydroxyalkanoate. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010, **46**(6), 607-613. DOI: 10.1134/S0003683810060086. ISSN 0003-6838. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S0003683810060086>
- [28] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Marie STANKOVA, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in *Cupriavidus necator* H16. *World Journal of*

- Microbiology and Biotechnology*. 2010, **26**(7), 1261-1267. DOI: 10.1007/s11274-009-0296-8. ISSN 0959-3993. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0296-8>
- [29] KOLLER, Martin, Lukáš MARŠÁLEK, Miguel Miranda DE SOUSA DIAS a Gerhart BRAUNEGG. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*. 2017, **37**, 24-38. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.001. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678416300115>
- [30] DIETRICH, Karolin, Marie-Josée DUMONT, Luis F. DEL RIO a Valérie ORSAT. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology*. 2019, **49**, 161-168. DOI: 10.1016/j.nbt.2018.11.004. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678418302176>
- [31] SAWANT, Shailesh S., Bipinchandra K. SALUNKE a Beom Soo KIM. Degradation of corn stover by fungal cellulase cocktail for production of polyhydroxyalkanoates by moderate halophile *Paracoccus* sp. LL1. *Bioresource Technology*. 2015, **194**, 247-255. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.07.019. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415009724>
- [32] CESÁRIO, M. Teresa, Rodrigo S. RAPOSO, M. Catarina M.D. de ALMEIDA, Frederik VAN KEULEN, Bruno S. FERREIRA, João P. TELO a M. Manuela R. da FONSECA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, **71**, 59-67. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002815>
- [33] OBRUCA, Stanislav, Sinisa PETRIK, Pavla BENESOVA, Zdenek SVOBODA, Libor EREMKA a Ivana MAROVA. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, **98**(13), 5883-5890. DOI: 10.1007/s00253-014-5653-3. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5653-3>
- [34] PAN, Wenyang, Joseph A. PERROTTA, Arthur J. STIPANOVIC, Christopher T. NOMURA a James P. NAKAS. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology*. 2012, **39**(3), 459-469. DOI: 10.1007/s10295-011-1040-6. ISSN 1367-5435. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1040-6>
- [35] NEELAMEGAM, Annamalai, Huda AL-BATTASHI, Saif AL-BAHRY a Sivakumar NALLUSAMY. Biorefinery production of poly-3-hydroxybutyrate using waste office paper hydrolysate as feedstock for microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*. 2018, **265**, 25-30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.11.002. ISSN 01681656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165617317352>
- [36] JENSEN, Claus Uhrenholt, Julie Katherine RODRIGUEZ GUERRERO, Sergios KARATZOS, Göran OLOFSSON a Steen Brummerstedt IVERSEN. Fundamentals of Hydrofaction™: Renewable crude oil from woody biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2017, **7**(4), 495-509. DOI: 10.1007/s13399-017-0248-8. ISSN 2190-6815. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13399-017-0248-8>
- [37] FILIP, Jiří. *Odpadové hospodářství*. 2. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002. ISBN 80-715-7608-5.

- [38] BLUNT, Warren, David LEVIN a Nazim CICEK. Bioreactor Operating Strategies for Improved Polyhydroxyalkanoate (PHA) Productivity. *Polymers*. 2018, **10**(11), 1197. DOI: 10.3390/polym10111197. ISSN 2073-4360. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/11/1197>
- [39] KOLLER, Martin. A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation*. 2018, **4**(2), 30. DOI: 10.3390/fermentation4020030. ISSN 2311-5637. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2311-5637/4/2/30>
- [40] KOLLER, Martin a Gerhart BRAUNEGG. Potential and Prospects of Continuous Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*. 2015, **2**(2), 94-121. DOI: 10.3390/bioengineering2020094. ISSN 2306-5354. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2306-5354/2/2/94>
- [41] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [42] MOŽEJKO, Justyna a Slawomir CIESIELSKI. Pulsed feeding strategy is more favorable to medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production from waste rapeseed oil. *Biotechnology Progress*. 2014, **30**(5), 1243-1246. DOI: 10.1002/btpr.1914. ISSN 87567938. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.1914>
- [43] GARCÍA, Andrés, Diana PÉREZ, Manuel CASTRO, Viviana URTUVIA, Tania CASTILLO, Alvaro DÍAZ-BARRERA, Guadalupe ESPÍN a Carlos PEÑA. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] of ultra-high molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2019, **94**(6), 1853-1860. DOI: 10.1002/jctb.5959. ISSN 0268-2575. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.5959>
- [44] LIM, Henry C. a Hwa Sung SHIN. *Fed-batch cultures: principles and applications of semi-batch bioreactors*. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. ISBN 978-052151336-4.
- [45] RASHID, M.M., Hizbullah ., Noor MOHAMMAD a M. Jakir H KHAN. Advanced Control Technique for Substrate Feed Rate Regulation of a Fed Batch Fermentation. *Asian Journal of Biochemistry*. 2012, **7**(1), 1-15. DOI: 10.3923/ajb.2012.1.15. ISSN 18159923. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajb.2012.1.15>
- [46] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2007, **34**(6), 457-461. DOI: 10.1007/s10295-007-0207-7. ISSN 1367-5435. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-007-0207-7>
- [47] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie: Pracovní sešit* [online]. Brno: Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně, 2016 [cit. 2019-05-16].

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PHA	polyhydroxyalkanoát(y)
scl	short-chain lenght
mcl	medium-chain lenght
lcl-PHA	long-chain lenght
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
PHB-HV	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P3HBV	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	poly(3-hydroxybutyrát- <i>co</i> -3-hydroxyvalerát)
3HV	3-hydroxyvalerát
NB	Nutrient broth
MSM	mineral salt medium
KV	kyselina valerová
etOH	ethanol
3HB	3-hydroxybutyrát